

Title	蛍光標識一本鎖抗体の合成と抗原の蛍光レシオ検出
Author(s)	吉越, 健輔
Citation	
Issue Date	2016-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/13534">http://hdl.handle.net/10119/13534</a>
Rights	
Description	Supervisor: 芳坂 貴弘, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	吉越健輔		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第398号		
学位授与年月日	平成28年3月24日		
論文題目	Synthesis of fluorescence labeled scFvs and fluorescent ratiometric detection of antigen (蛍光標識一本鎖抗体の合成と抗原の蛍光レシオ検出)		
論文審査委員	主査	芳坂 貴弘	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		大木 進野	同 教授
		藤本 健造	同 教授
		松村 和明	同 准教授
		瀧 真清	電気通信大学 准教授

## 論文の内容の要旨

Bio-based sensors for various target molecules are being used in a wide range of fields. Among them, protein-based fluorescent biosensors are very useful due to high selectivity and sensitivity. However, when the concentration of protein-based fluorescent biosensors is unknown, it is difficult to detect target molecules as fluorescence intensity changes in a quantitative manner. To solve this disadvantage, protein-based fluorescent biosensors that can detect target molecules as fluorescence ratio changes have been developed on the basis of fluorescence resonance energy transfer (FRET). In this research, I developed fluorescent-labeled single-chain antibody variable fragment (scFv) derivatives which enabled us to detect wide range of antigens in ratiometric manner.

In chapter 2, I synthesized double-labeled scFvs having TAMRA and Rhodamine Green at N- and C-termini, respectively, by using non-natural amino acid mutagenesis. For double-labeled scFvs against BGP (bone gla protein) and bisphenol A, fluorescence intensity ratio changes were observed upon the antigen-binding by the combination with FRET and fluorescence quenching. These result suggested that the double-labeled scFvs will be useful for quantitative detection of various target molecules.

In chapter 3, I explored acceptor and donor fluorophore pairs and optimized flexible linker length between the donor fluorophore and the C-terminus of scFvs to improve fluorescence ratio changes. I found that RhodamineRed significantly improved the fluorescence response for anti-bisphenol A scFv. Moreover, I revealed that the use of BODIPYFL-linked amino acid with a shorter linker and a shorter peptide linker at the C-terminus of anti-cMyc and bisphenol A scFvs improved fluorescence ratio change possibly because of decreased undesirable interaction. These findings will be valuable for construction of various double-labeled scFvs and their improvement.

In chapter 4, I incorporated Dansyl group as an environment-sensitive fluorescent probe into scFvs and examined fluorescence spectral properties of Dansyl-labeled scFvs. Four types of Dansyl-labeled scFvs against BGP, bisphenol A, cMyc, and phosphotyrosine showed fluorescence spectral changes upon the antigen-binding, this demonstrates that the environment-sensitive fluorescent probe can be applied to monitor environmental changes around the antigen-binding site and to detect antigens in a ratiometric manner. Dansyl-labeling will become an alternative strategy to design and synthesis of scFv-based fluorescent ratio probes when double-labeled scFv does not show large ratio change upon antigen-binding.

Throughout this study, I successfully developed new fluorescence ratio probes to detect target molecules. Further improvement of the present strategy will enable us to develop practical diagnostic reagents and cell imaging tools.

**Key word** : non-natural amino acid mutagenesis, single-chain antibody fragment, FRET and fluorescence quenching, environmental sensitive probe, fluorescence ratiometric detection

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質を用いた標的分子を検出技術は、生命科学分野の基礎研究や診断薬開発などの分野において有用である。特に蛍光を用いる手法は、簡易な測定装置を用いて高感度に計測できる利点がある。近年、抗体断片を連結した一本鎖抗体を蛍光分子で部位特異的に標識することで、標的分子（抗原）の結合を蛍光強度変化として検出できる手法が開発されている。しかしながら蛍光強度変化による検出は、細胞内などの蛍光標識抗体の濃度が一定とまらない環境下では適用が困難である。そこで本研究では、二つの波長での蛍光強度比によって抗原を検出できる新たな蛍光標識一本鎖抗体の合成および評価を行った。

まず、一本鎖抗体の N 末端に抗原検出用の蛍光標識アミノ酸を導入しつつ、C 末端に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のドナーとなる別の蛍光標識アミノ酸を導入した。このような二重蛍光標識一本鎖抗体は、ドナーを光励起した場合に FRET によりアクセプターも励起されるが、抗原非存在下ではアクセプターが蛍光消光されるため、主にドナーの蛍光のみが検出される。一方、抗原存在下では FRET は同様に起こるもののアクセプターの蛍光消光が解消されて、ドナーとアクセプターの両方の蛍光が検出されると期待される。実際に、無細胞翻訳系を用いて二重蛍光標識一本鎖抗体を合成して、抗原添加による蛍光スペクトル変化を測定したところ、抗原の結合によりドナーの蛍光強度は一定であるのに対し、アクセプターの蛍光強度が増加し、その結果として蛍光強度比が変化することが確認された。また、異なる抗原-抗体ペアを用いても、同様に抗原の結合に伴う蛍光強度比の変化が検出できた。続いて、上記の検出方法をさらに改良するために、蛍光分子の探索と分子構造の最適化を行った。蛍光分子の種類を変えたところ、抗体の種類によって適した蛍光分子の種類が異なっており、ビスフェノール A に対する抗体の場合は、ローダミンレッドを用いることで、蛍光強度変化が増加することがわかった。また、C 末端に導入するドナーとなる蛍光標識アミノ酸の分子構造中の分子鎖およびリンカーペプチドの長

さを変えたところ、リンカーを短くすることで蛍光変化への影響が低減することがわかった。これらの結果を踏まえて合成した二重蛍光標識一本鎖抗体は、蛍光強度比変化が従来よりも改善されることが確認できた。さらに、上記とは異なり環境応答性蛍光プローブを導入することで、抗原の結合による局所的な環境変化が蛍光波長シフトを引き起こし、その結果として抗原の結合を二波長の蛍光強度比の変化として検出できることも示した。抗体を用いたこれらの手法は、原理的に様々な抗原-抗体に対して適用できる一般的な手法となりうるため、バイオマーカー・環境汚染物質の検出や細胞イメージングなど様々な応用が期待できる。

以上、本論文は、抗原の結合を蛍光強度比変化として検出可能な新たな蛍光標識一本鎖抗体の合成を達成し、その改良を進めたものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。